

✓A. Pac

EXPRESS MAIL NO. EK715864038US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application of Jürgen Behrens and Walter Birchmeier

ATTORNEY USER NO.:

Filed on June 5, 2000

For CONDUCTINE PROTEIN AND A RELATED AGENT
FOR DIAGNOSING AND TREATING TUMOR ILLNESSES



23622

PATENT TRADEMARK OFFICE

UC833 U.S. PTO
09/587574

Attorney's Docket 0107-026P

Box New Patent Application - No Fee
Hon. Commissioner of Patents and Trademarks
Washington DC 20231

Sir:

NEW PATENT APPLICATION

Enclosed herewith for filing is a 10 page application (in German) comprised of specification, 21 claims, and 10 sheets of drawing.

The priority of German patent application No. 197 38 205.3 filed on September 2, 1997, is hereby claimed, the contents of which are incorporated herein by reference thereto. A certified copy will be filed in due course.

The filing fee and all other documents, including the English translation, will be filed later.

Gabriel P. Katona L.L.P.
708 Third Avenue, 14th Floor
New York, New York 10017

(212) 370-4000 Phone
(212) 370-7336 Fax

Respectfully submitted,

Respectfully submitted,

Gabriel P. Katona
Attorney for Applicant
Registration No. 20,829

CONDUCTINPROTEIN UND VERWANDTES MITTEL ZUR DIAGNOSE UND ZUR THERAPIE VON TUMOR-ERKRANKUNGEN**Beschreibung**

Die Erfindung betrifft neue Wege zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen durch Ausnutzung molekularbiologischer Zusammenhänge bei der Tumorentstehung. Sie betrifft im einzelnen ein Mittel zur Diagnose von Tumorerkrankungen, und darauf aufbauend ein Mittel zur Therapie. Sie betrifft ferner das neue Protein Conductin, seine Mutanten und Varianten sowie Teile davon, die dazu analogen cDNA-Sequenzen und deren Verwendung in gentherapeutischen und pharmakologischen Verfahren.

Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Cadherine und Catenine bilden Zelladhäsionskomplexe, die in zahlreichen Geweben für die Anheftung der Zellen aneinander verantwortlich sind. Die Cadherine sind Transmembranproteine und stellen den direkten Kontakt zwischen benachbarten Zellen her. - α , β - und γ -Catenin sind zytoplasmatische Komponenten, die die Cadherine mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden. Neben der Funktion bei der Zelladhäsion haben Catenine auch eine entscheidende Rolle bei Signaltransduktionsprozessen. β -Catenin in Vertebraten und das homologe Segmentpolaritäts-Genprodukt Armadillo in Drosophila werden durch den Wnt/Wingless-Signalweg stabilisiert (Nusse, R., Cell 89, 321-323, 1997). Dies führt zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen, nicht an Cadherin gebundenen Fraktion dieser Proteine, die daraufhin mit HMG-Transkriptionsfaktoren der LEF-1/TCF-Familie wechselwirken können. Als Resultat wird β -Catenin/Armadillo in den Zellkern transportiert, wo es zusammen mit den LEF/TCF-Proteinen an DNA bindet und bestimmte Gene aktiviert (Behrens, J. et. al., Nature 382, 638-642, 1996).

Dieser Signalweg spielt auch eine Rolle bei der Tumorentstehung. In Kolonepithelzellen wird der zytoplasmatische Pool von β -

Catenin durch das Tumorsuppressor-Genprodukt APC (Adenomatosis Polyposis Coli) streng reguliert. Mutationen von APC, wie sie in etwa 80% aller Kolonkarzinome auftreten, führen zu verkürzten Formen des APC Proteins, die nicht mehr in der Lage sind β -Catenin zu destabilisieren. Dadurch findet man in diesen Tumoren permanente Komplexe von β -Catenin mit dem HMG-Transkriptionsfaktor TCF-4, welche für die Transformation der Zellen verantwortlich gemacht werden. Diese Theorie wird gestützt durch den kürzlichen Befund, daß in Tumoren, in denen APC nicht verändert ist, Mutationen von β -Catenin auftreten. Diese führen ebenfalls zur zytoplasmatischen Stabilisierung von β -Catenin und zur Assoziation mit LEF-1/TCF-Faktoren (Morin, P.J. et. al., Science 275, 1787-1790).

Die Erfindung hat das Ziel, einen neuen Weg zur Verhinderung der Tumorentstehung zu finden. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Kontrolle der Regulation von β -Catenin in Körperzellen zu entwickeln.

Gegenstand der Erfindung ist ein neues Protein, welches an β -Catenin bindet und zu dessen zytoplasmatischen Abbau führt. Dieses Protein hat die Aminosäuresequenz gemäß Abb. 1 und wurde als **CONDUCTIN** bezeichnet.

Das Erfindung beruht nun auf der eigenen Erkenntnis, daß Conductin über eine β -Catenin-Bindungsdomäne an β -Catenin, über eine GSK 3 β -Bindungsdomäne an GSK 3 β und über eine sogenannte RGS-Domäne (Regulator of G-Protein Signalling) an APC-Fragmente bindet. Dadurch kommt es zum zytoplasmatischen Abbau von β -Catenin und in Vertebraten zur Blockade des Wnt/Wingless-Signalwegs. Damit ist klar, daß Conductin ein wichtiger Regulator der β -Catenin-Funktion ist und im Zusammenspiel mit APC zur Tumorsuppression beiträgt.

Davon abgeleitet betrifft die Erfindung ein Mittel zur Diagnose von Tumorerkrankungen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß das Vorhandensein und die Menge von Conductin, seiner Mutanten und Varianten oder seiner Teile in Körperzellen nachgewiesen

wird. Dieser Nachweis kann auf der Proteinebene mit spezifischen Antikörpern durchgeführt werden, speziell mit monoklonalen Antikörpern.

Die Diagnose von Tumorerkrankungen kann gemäß der Erfindung auch auf der Genebene erfolgen. Dazu werden mit ausgewählten Primern und cDNA-Sonden, die aus der Gensequenz des Conductins abgeleitet sind,

- das Gen, das für Conductin, seine Mutanten und Varianten oder Teile davon kodiert, bzw.
- mRNA-Sequenzen, die von diesen Genen abgelesen werden, nachgewiesen.

Das erfindungsgemäße Mittel zur Therapie von Tumorerkrankungen enthält Substanzen, die die Wirkung des Conductins im Körper aktivieren/reaktivieren. Das sind vor allem Mittel, die den Genpromoter des Conductins aktivieren bzw. Mittel, die die Stabilität der von den Conductin-Genen abgeleiteten m-RNA-Sequenzen erhöht. Das Hauptziel aller dieser Mittel besteht erfindungsgemäß darin, die Aktivität des Conductins in den Körperzellen zu erhöhen. Dazu kommen u. a. kleinmolekulare Substanzen in Betracht, die z. B. durch High-Througput-Number-Screening gefunden werden.

Die Erfindung umfaßt auch gentherapeutische Mittel, enthaltend Gene, die für Conductin, seine Mutanten und Varianten oder Teile davon kodieren, bzw. mRNA-Sequenzen, die von diesen Genen abgelesen werden.

Unter Schutz gestellt wird ferner das neue Protein Conductin gemäß Abb. 1 - SEQ ID No. 1, seine Mutanten und Varianten sowie Teile davon. Besonders bevorzugte Teilsequenzen sind die Aminosäuren 78-200 (RGS) - SEQ ID No. 2, 343-396 (GSK 3 β -Bindungsdomäne) - SEQ ID. No. 3, 397-465 (β -Catenin-Bindungsdomäne) - SEQ ID No. 4 und 783-833 (Dishevelled Homologie-Region) - SEQ ID No. 5. Zum Schutzzumfang gehören auch Teilsequenzen des Adenomatosis Poliposis Coli (APC),

gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenzen 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778 und 1995-2083 als RGS-Domänen-Interaktionsorte.

Gleichermaßen beansprucht werden die analogen cDNA-Sequenzen, insbesondere die volle cDNA-Sequenz des Conductins (Basenpaare 1-2825) gemäß Abb. 2 - SEQ ID No. 6 sowie die Teilsequenzen des Conductins der Nukleotidfolge 446-814 (RGS-Genabschnitt) - SEQ ID No. 7, der Nukleotidfolge 1241-1402 (Genabschnitt der GSK 3 β -Bindungsdomäne) - SEQ ID No. 8, 1403-1609 (Genabschnitt der β -Catenin-Bindungsdomäne) - SEQ ID No. 9 und der Nukleotidfolge 2561-2713 (Genabschnitt der Dishevelled Homologie-Region) - SEQ ID No. 10.

Die Erfindung wird durch die folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

Conductin wurde durch einen Hefe 2-Hybrid Screen als β -Catenin-Interaktionspartner identifiziert. Die vollständige cDNA-Sequenz wurde daraufhin isoliert und sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Conductin ist in Abb. 1 gezeigt, die Nukleotidsequenz in Abb. 2 und die Gegenüberstellung von Aminosäure- und Nukleotidsequenz in Abb. 3. Conductin besteht aus 840 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 92,8 kDa. Durch Sequenzvergleiche wurde im Conductin eine RGS-Domäne (Aminosäuren 78-200) und eine zu dem Protein Dishevelled verwandte Domäne (Aminosäuren 783-833, Dishevelled Homologie-Region) identifiziert (Abb. 1-3). Die GSK 3 β - und β -Catenin-Bindungsdomänen (Aminosäuren 343-396 bzw. 397-465) wurden durch Interaktionsstudien im 2-Hybrid-System entdeckt (Abb. 4). Es zeigte sich, daß diese Domänen ausreichend und notwendig für die Bindung an GSK 3 β bzw. β -Catenin sind (Abb. 4), wohingegen die RGS- und Dishevelled Homologie-Region nicht beteiligt sind. Die Wechselwirkung von Conductin mit GSK 3 β bzw. β -Catenin wurde auch in Co-Immunpräzipitationsexperimenten biochemisch bewiesen.

Die Wirkung von Conductin auf β -Catenin wurde in SW480 Zellen untersucht. In diesen Zellen ist das Tumor-Suppressor-Genprodukt

APC mutiert, wodurch es zu einem Anstieg des cytoplasmatischen und vor allem nukleären Gehalts von β -Catenin kommt. Die Einbringung von Conductin in diese Zellen führt zu einem drastischen Abbau von β -Catenin, wodurch die Zelle von cytoplasmatischem und im Zellkern befindlichen β -Catenin depletiert wird (Abb. 4). Diese Wirkung auf den Gehalt von β -Catenin ist gleich stark wie die von nichtmutiertem APC, woraus geschlossen werden kann, daß Conductin ebenfalls als Tumorsuppressor durch Regulation von β -Catenin wirkt. Es wurde außerdem gezeigt, daß Conductin den Wnt/Wingless-Signalweg auch in Xenopus-Embryonen durch seine Wirkung auf β -Catenin hemmt.

Es wurde außerdem festgestellt, daß Conductin mit APC direkt interagiert. APC-Fragmente von Aminosäure 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778 und 1995-2083 wurden als Interaktionsstellen für Conductin identifiziert. In Conductin erfolgt die Bindung an APC über die RGS-Domäne; dieser Bereich ist ausreichend und notwendig für die Interaktion. Die anderen Domänen in Conductin sind nicht beteiligt (Abb. 4).

009090:42928960

Legende zu den Abbildungen:

Abb. 1

Aminosäuresequenz von Conductin

Die Conductin cDNA kodiert ein Protein von 840 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 92,8 kDa. Die RGS-Domäne (doppelt unterstrichen), die β -Catenin-Bindungsdomäne (einfach unterstrichen) und die Dishevelled Homologie-Region sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Abb. 2

Nukleotidsequenz von Conductin von Position 1-2825

Die Sequenzbereiche sind analog zu Abb.1 markiert.

Abb. 3

Gegenüberstellung von Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Conductin

Abb. 4

Analyse der Interaktion von Conductin und seinen Teilen mit β -Catenin, APC und GSK 3 β

Das Conductin Protein und abgeleitete Teilstücke sind schematisch dargestellt. Hervorgehoben sind die RGS-Domäne (RGS), die GSK 3 β -Bindungsdomäne (GSK BD) und die β -Catenin-Bindungsstelle (β -BD). Die Interaktion mit β -Catenin mit den APC Fragmenten von Aminosäure 1464-1604 (APCfr.1) und 1516-1595 (APCfr. 2) und GSK 3 β wurde im Hefe 2-Hybrid Assay untersucht und als β -Galaktosidase Einheiten quantifiziert. Man erkennt, daß die Bindung an β -Catenin auf die β -Catenin-Bindungsstelle beschränkt ist, die anderen Teile des Proteins tragen dazu nicht bei. Die Analyse zeigt außerdem die ausschließliche Interaktion von APC mit der RGS-Domäne von Conductin. Vergleichbare Ergebnisse für die Bindung an die RGS-Domäne wurden mit APC Fragmenten von Aminosäure 1690-1778 und 1995-2083 erhalten. Der

Abbau von β -Catenin in SW480 Zellen durch Conductin wurde nach transienter Expression der angegebenen Proteine und Immunfluoreszenz-Färbung von β -Catenin analysiert. Nur Teilstücke von Conductin, die an β -Catenin binden, führen zu dessen Abbau. Die Analyse zeigt schließlich die Bindung von GSK 3 β an die GSK 3 β -Bindungsdomäne von Conductin.

005050-4656560

patentan/mdc/ 9713 ansp. doc

(Mikroexzemplar)

Patentansprüche

1. Mittel zur Diagnose von Tumoren, enthaltend eine Substanz, mit der
 - Conductin gemäß Abb. 1 oder Teile davon bzw.
 - Gene, die für Conductin oder Teile davon kodieren, bzw.
 - m-RNA-Sequenzen, die von diesen Genen abgelesen werden, nachgewiesen werden.
2. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1, enthaltend spezifische Antikörper gegen Conductin oder Teile davon.
3. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifischen Antikörper monoklonale Antikörper sind.
4. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1, enthaltend korrespondierende Oligonukleotid-Primer bzw. DNA-Sonden zum Nachweis der Gene und deren Mutationen.
5. Mittel zur Diagnose von Tumoren nach Anspruch 1, enthaltend korrespondierende Oligonukleotid-Primer bzw. DNA-Sonden zum Nachweis der RNA-Sequenzen.
6. Mittel zur Therapie von Tumoren, enthaltend eine Substanz, die die Wirkung des Conductins im Körper aktiviert/reaktiviert.
7. Mittel nach Anspruch 6, enthaltend eine Substanz, die den Genpromoter des Conductins aktiviert.
8. Mittel nach Anspruch 6, enthaltend eine Substanz, die die Stabilität der mRNA-Sequenzen erhöht.
9. Mittel nach Anspruch 6, enthaltend eine Substanz, die die Aktivität des Conductins erhöht.

10. Conductin, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 1-840 gemäß Abb. 1 (SEQ ID No. 1), wobei Abb. 1 Bestandteil dieses Anspruchs ist.

11. Teilsequenz des Conductins nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 78-200 (RGS-Domäne) der Abb. 1 (SEQ ID No. 2).

12. Teilsequenz des Conductins nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 343-396 (GSK 3 β) der Abb. 1 (SEQ ID No. 3).

13. Teilsequenz des Conductins nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 397-465 (β -Catenin-Bindungsdomäne) der Abb. 1 (SEQ ID No. 4).

14. Teilsequenz des Conductins nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz 783-833 (Dishevelled Homologie-Region) der Abb. 1 (SEQ ID No 5).

15. Teilsequenzen des Adenomatosis Poliposis Coli (APC), gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenzen 1464-1604, 1516-1595, 1690-1778 und 1995-2083 als RGS-Domänen-Interaktionsorte.

16. cDNA-Sequenz des Conductins der Nukleotidfolge 1-2825 der Abb. 2 (SEQ ID No. 6), wobei Abb. 2 Bestandteil dieses Anspruchs ist.

17. cDNA-Teilsequenz des Conductins der Nukleotidfolge 446-814 (RGS-Genabschnitt) der Abb. 2 (SEQ ID No. 7).

18. cDNA-Teilsequenz des Conductins der Nukleotidfolge 1241-1402 (Genabschnitt der GSK 3 β -Bindungsdomäne) der Abb. 2 (SEQ ID No. 8).

19. cDNA-Teilsequenz des Conductins der Nukleotidfolge 1403-1609 (Genabschnitt der β -Catenin-Bindungsdomäne) der Abb. 2 (SEQ ID No. 9).

20. cDNA-Teilsequenz des Conductins der Nukleotidfolge 2561-2713 (Genabschnitt der Dishevelled Homologie-Region) der Abb. 2 (SEQ ID No. 10).

21. Verwendung des Conductin-Gens für die Gentherapie von Tumorerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Vektor mit dem Conductin-Gen konstruiert wird, anschließend ein Gentransfer in den menschlichen Körper erfolgt und damit die Aktivität des Conductins in Körperzellen wiederhergestellt wird.

20030314 14:37:30

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

1/10

MSSAVLVTLTLLPDPSSSFREDAPRPPVPGEEGETPPCQPSVGKVQSTKPMVSSNARNED 60
 GLGEPEGRASPDSPLTRWTKSLHSLLDGODGAYLERTFLEREKCVDTLDFWFACNGFROM 120
 NLKDTKTLRVAKAIYKRYIENNSVVSQOLKPKATKTYIRDGIKKQQIGSVMFDQAQTEIOA 180
 VMEENAYQVFLTSDIYLEYVRSGGENTAYMSNGGLGSLKVLCGYLPTLNEEEEWTCADLK 240
 CKLSPTVVGLSSKTLRATASVRSTETAENGFERSFKRSDPVNPHYVSGSYVFAFATSANDS 300
 ELSSDALTDDSMSMTDSSVDGVPYRMGSKKQLQREMHRSVKANGQVSLPHFPRTHLRPA 360
 EMTFVEPAAFPAELISRLEKLELESRSLSLEERLQQIREDEEKEGSEQALSSRDGAPVQ 420
 HPLALLPSGSYEEDPQTILDDHLSRVLKTGGCQSPGVGRYSPRSRSPDHHHQHHHQCH 480
 TLLSTGGKLPVVAACPLLGGKSFLTQTTKHVVHHYTHHHAVPKTKEETAEATQVRCL 540
 CPGGTDYYCYSKCKSHPKAPEFLPGEQFCGSRGGTLPKRNAGTEPGLALSARDGGMSSA 600
 AGGPQLPGEEDRSQDVWQWMLESERQSKSKPMSAQSTIRKSYPLESARAAPGERVSRHHL 660
 LGASGHSRSVARAHPTQDPAMPPLTPPNTLAQLEEAARLAEVSKPQKQRCVVSQORD 720
 PNHSAAGQAGASPFANPSLAPEDHKEPKKLASVHALQASELVVTVYFFCGEETPYRMLKA 780
 QSLTLGHFKEQLSKKGNRYRYFKRASDEFACGAVFEETWDDDETVLPMYEGRILCKVERID 840

Abb. 1

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

2/10

CAGCCGTTTCGCGATGGATTTCGGGGCCACCCGGAGCCGAGGCGTCCGGCTCCCCAAAGG 60
 AGAGCTTTGCTGTAAAAGAGAGAGGCTCAGATGAGCCCCTGCTGACTTAAGAGAGACCA 120
 AGCCGATTGCTGAGAGGAAGTGAAGAAGAAAAAGGAGGAGGAGGAAAAAAGCAAAAC 180
 AAAATCCAACTCAGTGAGACGCTCTCCCTACCATGAGTAGCGCCGTGTIAGTACTCT 240
 CCTTCAGATCCACAGCAGGCTTCGCGAGGATGCTCCGCGCCCCCGGTTCCGGGAGA 300
 AGAAGGGGAGACCCACCGTGTACGCTAGTGTGGGCAAGGTCCAGTCCACCAACCTAT 360
 GCCCGTTTCTCTAATGCTAGCGGAATGAACATGGACTGGGGGAGCCCCAGGGCGGGC 420
 CTCCCCGATTCCCTTTGACCAGGTGGACCAAGTCTTTACACTCCTTGTGGGTGACCA 480
GGATGGTGCATACCTCTTCGGACTTTCTGGAGAGGGAGAAATGTGTGCATACCTTGA 540
CTTCTGGTTTGTCTGTAATGGGTTCAAGCAGATGAACCTGAAGGATACCAAACTTTGCG 600
AGTGGCCAAAGCAATCTATAAGAGGTACATTGAGAACAACAGCGTTGTCTCAAGCAGCT 660
GAAAGCCCGCCACCAAGACCTACATACGAGATGGCATCAAGAAGCAACAGATCGGCTCGGT 720
CATGTTTGACCAAGCACAGACCCGAGATCCAGGCAAGTGTGGAGGAAATGCCTACCAAGT 780
GTTCCTTGACTTCTGACATTTACCTGGAATATGTGAGGAGTGGGGGGGAAAAACAGCTTA 840
 CATGAGTAACGGGGGACTGGGGAGCCTAAAGGTCTIATGTGGTACCTCCCCACCTTGAA 900
 TGAAGAAGAGGAGTGGACGTGTGCCGACCTCAAGTGCAAACTCTCACCACCGTGGTTGG 960
 CTTGTCCAGCAAACTCTTCGGGCCACCGCGAGTGTGAGATCCACGGAAACAGCTGAAAA 1020
 CGGATTCAGGTCTTCAAGAGAAGCGACCCAGTCAATCCTIATCAGTAGGTTCCGGCTA 1080
 TGTCTTTGACACCAAGCCACCAAGCGCAACGACAGCGAGTATCCAGCGACGCACTGACCGA 1140
 CGATTCCATGTCCATGACGGCAGTAGCGTAGATGGAGTCCCTCCTTACCGCATGGGGAG 1200
 TAAGAAACAGCTCCAGAGAGAGATGCATCGCAGTGTGAAGGCCAATGGCCAGTGTCTCT 1260
ACCTCATTTTTCCGAGAACCCACCGCTGCCCAAGGAGATGACGCTGTGGAACCTGCTGC 1320
CTTCGCGCGCGAGCTCATCTCCAGGCTGGAGAACTGAACTGGAGCTGGAAAGCCGCCA 1380
TAGTCTGGAGGAGCGGCTGCAGCAGATCCGGGAGGATGAAGAAAAGGAGGGGTCTGAGCA 1440
GGCCCTGAGCTACGGGATGGAGCACCGGTCCAGCACCCCTGGCCCTCTTACCTCCCG 1500
CAGCTATGAAGAGGACCCACAAACCATTTTGGACGACCACCTCTCCAGGTCCTCAAGAC 1560
CCCCGGCTGTCAATCCCCCTGGTGTGGGTTCGTACAGCCCCACGGTCCCGCTCCCCGACCA 1620
 CCACCACCAGCACCAACCATCAGCAGTGTATACCTTCTTTGACTGGGGGCAAGCT 1680
 GCCCCCGTGGCTGCTTGGCCCTCTTGGAGGCAAGAGCTTCTGACCAACAGACGAC 1740
 GAAGCACGTTACCAACCACTACATCCACCACCGCGTCCCCAAGACCAAGGAGGAGAT 1800
 CGAGGCAGAAGCCACACAGAGAGTCCGCTGCTCTGTCTGGGGGAACAGATTATITG 1860
 CTACTCCAAATGCAAAAGCCACCCGAAGGCTCCAGAGCCCCCTGCTGGGGAGCAGTTTG 1920
 TGGCAGCAGAGGTGCTTACCTTGCCAAAACGGAATGCAAGGGCACCGAACCGGTCTTTC 1980
 ACTGTGCGCCAGGGATGGAGGGATGTCCAGTGCAGCGGGGGGGCCCCAGCTTCTGGGGA 2040
 AGAAGGAGACCGGTTCACAGGATGTCTGGCAGTGGATGTGGAGAGTGAGCGGCAGAGCAA 2100
 GTCCAAGCCCCATAGTGCCCAAAGCATAAGAAAGAGCTACCCATTGGAGTCTGCCCGTGC 2160
 GGCCCCAGGAGAACCAGTCAAGCGGACCATCTGTTGGGGGCCAGCGACACTCCCGCTC 2220
 AGTGGCCCGGCTCACCATTIACCCAGGACCTGCAATGCTCCCTTACCCACCCAA 2280
 CACTTTGGCAGCTAGAGGAAGCTGCGCAGGCTGCGAGAGGTGTGGAAGCCCCAGAA 2340
 GCAGCGGTGCTGCGTGGCCAGTCAGCAGAGGGACAGGAACCACTCGGCTGCTGCTCAGGC 2400
 AGGAGCCTCACCCTTCGCCAACCCAGCCTGGCTCCAGAAGATCAAAAGAGCCAAAGAA 2460
 ACTGGCAAGTGTCCACGCGCTCCAGGCCAGTGAGCTGGTGTGACCTACTTTTTCTGTGG 2520
 AGAAGAAATTCCATACAGGAGGATGCTGAAGGCTCAAAGCTTGACCCTGGGCCACTTCAA 2580
 GGAGCAGCTCAGCAAAAAGGGAAATTACAGGTATTATTTCAAGAAGGCGAGTGACGAATT 2640
 TGCCCTGCGGAGCAGTTTTTGGAGAGATCTGGGACGACGAGACAGTGTCCCCATGTACGA 2700
 AGGCAGGATCCTGGGCAAGTGGAGAGGATCGACTGAGCCTTGGCCTCTCGGCGTGCAA 2760
 CCTGGGCAAGCACCTCGGCGTGACCATGGAGCCGAAGCCAGAGACCTGTCTCAGGCC 2820
 TACGC 2825

Abb. 2

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

3/10

215 ATG AGT AGC GCC GTG TTA GTG ACT
 1 M S S A V L V T
 CTC CTT CCA GAT CCC AGC AGC AGC TTC
 L L P D P S S S F
 CGC GAG GAT GCT CCG CGG CCC CCG GTT
 R E D A P R P P V
 CCG GGA GAA GAA GGG GAG ACC CCA CCG
 P G E E G E T P P
 TGT CAG CCT AGT GTG GGC AAG GTC CAG
 C Q P S V G K V Q
 TCC ACC AAA CCT ATG CCC GTT TCC TCT
 S T K P M P V S S
 AAT GCT AGG CGG AAT GAA GAT GGA CTG
 N A R R N E D G L
 GGG GAG CCC GAG GGG CGG GCC TCC CCC
 G E P E G R A S P
 GAT TCC CCT TTG ACC AGG TGG ACC AAG
 D S P L T R W T K
 TCT TTA CAC TCC TTG TTG GGT GAC CAG
S L H S L L G D Q
 GAT GGT GCA TAC CTC TTC CGG ACT TTC
D G A Y L F R T F
 CTG GAG AGG GAG AAA TGT GTG GAT ACG
L E R E K C V D T
 CTG GAC TTC TGG TTT GCT TGT AAT GGG
L D F W F A C N G

Abb. 3

4/10

TTC AGG CAG ATG AAC CTG AAG GAT ACC
F R O M N L K D T

AAA ACT TTG CGA GTG GCC AAA GCA ATC
K T L R V A K A I

TAT AAG AGG TAC ATT GAG AAC AAC AGC
Y K R Y I E N N S

GTT GTC TCC AAG CAG CTG AAG CCC GCC
V V S K O L K P A

ACC AAG ACC TAC ATA CGA GAT GGC ATC
T K T Y I R D G I

AAG AAG CAA CAG ATC GGC TCG GTC ATG
K K O O I G S V M

TTT GAC CAG GCA CAG ACC GAG ATC CAG
F D O A O T E I O

GCA GTG ATG GAG GAA AAT GCC TAC CAG
A V M E E N A Y O

GTG TTC TTG ACT TCT GAC ATT TAC CTG
V F L T S D I Y L

GAA TAT GTG AGG AGT GGG GGG GAA AAC
E Y V R S G G E N

ACA GCT TAC ATG AGT AAC GGG GGA CTG
T A Y M S N G G L

GGG AGC CTA AAG GTC TTA TGT GGC TAC
G S L K V L C G Y

CTC CCC ACC TTG AAT GAA GAA GAG GAG
L P T L N E E E E

Abb. 3

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

5/10

TGG W	ACG T	TGT C	GCC A	GAC D	CTC L	AAG K	TGC C	AAA K
CTC L	TCA S	CCC P	ACC T	GTG V	GTT V	GGC G	TTG L	TCC S
AGC S	AAA K	ACT T	CTT L	CGG R	GCC A	ACC T	GCG A	AGT S
GTG V	AGA R	TCC S	ACG T	GAA E	ACA T	GCT A	GAA E	AAC N
GGA G	TTC F	AGG R	TCC S	TTC F	AAG K	AGA R	AGC S	GAC D
CCA P	GTC V	AAT N	CCT P	TAT Y	CAC H	GTA V	GGT G	TCC S
GGC G	TAT Y	GTC V	TTT F	GCA A	CCA P	GCC A	ACC T	AGC S
GCC A	AAC N	GAC D	AGC S	GAG E	TTA L	TCC S	AGC S	GAC D
GCA A	CTG L	ACC T	GAC D	GAT D	TCC S	ATG M	TCC S	ATG M
ACG T	GAC D	AGT S	AGC S	GTA V	GAT D	GGA G	GTC V	CCT P
CCT P	TAC Y	CGC R	ATG M	GGG G	AGT S	AAG K	AAA K	CAG Q
CTC L	CAG Q	AGA R	GAG E	ATG M	CAT H	CGC R	AGT S	GTG V
AAG K	GCC A	AAT N	GGC G	CAA Q	GTG V	TCT S	CTA L	CCT P
CAT H	TTT F	CCG P	AGA R	ACC T	CAC H	CGC R	CTG L	CCC P

Abb. 3

ERSATZBLATT (REGEL 26)

6/10

AAG GAG ATG ACG CCT GTG GAA CCT GCT
 K E M T P V E P A

GCC TTC GCC GCC GAG CTC ATC TCC AGG
 A F A A E L I S R

CTG GAG AAA CTG AAA CTG GAG CTG GAA
 L E K L K L E L E

AGC CGC CAT AGT CTG GAG GAG CGG CTG
 S R H S L E E R L

CAG CAG ATC CGG GAG GAT GAA GAA AAG
 Q Q I R E D E E K

GAG GGG TCT GAG CAG GCC CTG AGC TCA
 E G S E O A L S S

CGG GAT GGA GCA CCG GTC CAG CAC CCC
 R D G A P V O H P

CTG GCC CTC CTA CCC TCC GGC AGC TAT
 L A L L P S G S Y

GAA GAG GAC CCA CAA ACC ATT TTG GAC
 E E D P O T I L D

GAC CAC CTC TCC AGG GTC CTC AAG ACC
 D H L S R V L K T

CCC GGC TGT CAA TCC CCT GGT GTG GGT
 P G C O S P G V G

CGC TAC AGC CCA CGG TCC CGC TCC CCC
 R Y S P R S R S P

GAC CAC CAC CAC CAG CAC CAC CAC CAT
 D H H H Q H H H H

Abb. 3

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

7/10

CAG	CAG	TGT	CAT	ACC	CTT	CTT	TCG	ACT
Q	Q	C	H	T	L	L	S	T
GGG	GGC	AAG	CTG	CCC	CCC	GTG	GCT	GCT
G	G	K	L	P	P	V	A	A
TGC	CCC	CTC	CTT	GGA	GGC	AAG	AGC	TTC
C	P	L	L	G	G	K	S	F
CTG	ACC	AAA	CAG	ACG	ACG	AAG	CAC	GTT
L	T	K	Q	T	T	K	H	V
CAC	CAC	CAC	TAC	ATC	CAC	CAC	CAC	GCC
H	H	H	Y	I	H	H	H	A
GTC	CCC	AAG	ACC	AAG	GAG	GAG	ATC	GAG
V	P	K	T	K	E	E	I	E
GCA	GAA	GCC	ACA	CAG	AGA	GTC	CGC	TGC
A	E	A	T	Q	R	V	R	C
CTC	TGT	CCT	GGG	GGA	ACA	GAT	TAT	TAT
L	C	P	G	G	T	D	Y	Y
TGC	TAC	TCC	AAA	TGC	AAA	AGC	CAC	CCG
C	Y	S	K	C	K	S	H	P
AAG	GCT	CCA	GAG	CCC	CTG	CCT	GGG	GAG
K	A	P	E	P	L	P	G	E
CAG	TTT	TGT	GGC	AGC	AGA	GGT	GGT	ACC
Q	F	C	G	S	R	G	G	T
TTG	CCA	AAA	CGG	AAT	GCA	AAG	GGC	ACC
L	P	K	R	N	A	K	G	T
GAA	CCG	GGT	CTT	GCA	CTG	TCG	GCC	AGG
E	P	G	L	A	L	S	A	R
GAT	GGA	GGG	ATG	TCC	AGT	GCA	GCG	GGG
D	G	G	M	S	S	A	A	G

Abb. 3

ERSATZBLATT (REGEL 26)

005050"44543500

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

8/10

GGC	CCC	CAG	CTT	CCT	GGG	GAA	GAA	GGA
G	P	Q	L	P	G	E	E	G
GAC	CGG	TCA	CAG	GAT	GTC	TGG	CAG	TGG
D	R	S	Q	D	V	W	Q	W
ATG	TTG	GAG	AGT	GAG	CGG	CAG	AGC	AAG
M	L	E	S	E	R	Q	S	K
TCC	AAG	CCC	CAT	AGT	GCC	CAA	AGC	ATA
S	K	P	H	S	A	Q	S	I
AGA	AAG	AGC	TAC	CCA	TTG	GAG	TCT	GCC
R	K	S	Y	P	L	E	S	A
CGT	GCG	GCC	CCA	GGA	GAA	CGA	GTC	AGC
R	A	A	P	G	E	R	V	S
CGG	CAC	CAT	CTG	TTG	GGG	GCC	AGC	GGA
R	H	H	L	L	G	A	S	G
CAC	TCC	CGC	TCA	GTG	GCC	CGG	GCT	CAC
H	S	R	S	V	A	R	A	H
CCA	TTT	ACC	CAG	GAC	CCT	GCA	ATG	CCT
P	F	T	Q	D	P	A	M	P
CCC	CTT	ACC	CCA	CCC	AAC	ACT	TTG	GCA
P	L	T	P	P	N	T	L	A
CAG	CTA	GAG	GAA	GCC	TGC	CGC	AGG	CTG
Q	L	E	E	A	C	R	R	L
GCA	GAG	GTG	TCG	AAG	CCC	CAG	AAG	CAG
A	E	V	S	K	P	Q	K	Q
CGG	TGC	TGC	GTG	GCC	AGT	CAG	CAG	AGG
R	C	C	V	A	S	Q	Q	R

Abb. 3

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

9/10

GAC AGG AAC CAC TCG GCT GCT GGT CAG
D R N H S A A G Q

GCA GGA GCC TCA CCC TTC GCC AAC CCA
A G A S P F A N P

AGC CTG GCT CCA GAA GAT CAC AAA GAG
S L A P E D H K E

CCA AAG AAA CTG GCA AGT GTC CAC GCG
P K K L A S V H A

CTC CAG GCC AGT GAG CTG GTT GTC ACC
L O A S E L V V T

TAC TTT TTC TGT GGA GAA GAA ATT CCA
Y F F C G E E I P

TAC	AGG	AGG	ATG	CTG	AAG	GCT	CAA	AGC
Y	R	R	M	L	K	A	Q	S

TTG	ACC	CTG	GGC	CAC	TTC	AAG	GAG	CAG
L	T	L	G	H	F	K	E	Q

CTC AGC AAA AAG GGA AAT TAC AGG TAT
L S K K G N Y R Y

TAT TTC AAG AAG GCG AGT GAC GAA TTT
Y F K K A S D E F

GCC TGC GGA GCA GTT TTT GAG GAG ATC
A C G A V F E E I

TGG GAC GAC GAG ACA GTG CTC CCC ATG
W D D E T V L P M

TAC GAA GGC AGG ATC CTG GGC AAA GTG
Y E G R I L G K V

GAG AGG ATC GAC TGA 2737
E R I D Stop

Abb. 3

WO 99/11780

PCT/DE98/02621

10/10

Abbau von β -Catenin
in SW480 Zellen

Interaktion mit			GSK3 β
β -Catenin	APC #1	APC #2	
220	6	9	18
490	0	0	n.d.
1060	0	0	670
0	190	260	0
0	110	250	84
0	390	390	0

Constructin
Konstrukte

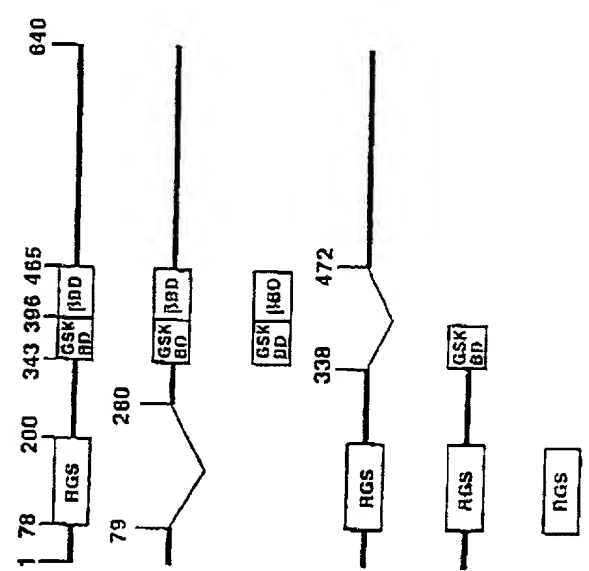


Abb. 4